

РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТУ РЕКОМБІНАНТНОЇ СТРЕПТОКІНАЗИ

К.М. НЕСТЕРОВА¹, О.М. ОГУРЦОВ²

¹ *магістрант кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії, НТУ «ХПІ», Харків, УКРАЇНА*

² *завідувач кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії, д-р. фіз.-мат. наук, проф., НТУ «ХПІ», Харків, УКРАЇНА*

**email: MVNesterov@ukr.net*

Окклюзія периферичних судин, причиною якої є тромбоз, веде до ряду серйозних патологічних станів, таких як інфаркт міокарда, легенева емболія, тромбоз глибоких вен, цереброваскулярні порушення і гострі артеріальні периферичні оклюзії. Ці захворювання лідирують за кількістю ускладнень і смертності пацієнтів. Після того, як була з'ясована патофізіологія тромбоутворення, були зроблені зусилля по розробці лікарських засобів для тромболітичної терапії [1].

Тромболітична терапія входить до переліку стандартних заходів при крупноочаговом інфаркті міокарда. Встановлено, що при її використанні в перші 6 годин від початку інфаркта міокарда, вона рятує потенційно некротизований міокард, покращує функцію лівого шлуночка і, найголовніше, знижує показники смертності [2].

До теперішнього часу створено ряд препаратів для боротьби із тромбами. Серед цих засобів стрептокіназа – високоочищений фермент, одержаний з культивованого штаму β-гемолітичних стрептококів групи С. Являє собою білок з молекулярною масою приблизно 50 000 дальтон. Проявляє фібринолітичну активність. З плазміногеном стрептокіназа утворює комплекс, що активує перехід плазміногену (крові або кров'яного згустку) в плазмін. Плазмін, який виявляє протеолітичну ферментативну активність, зумовлює лізис ниток фібрину кров'яних згустків, деградацію фібриногену та інших протеїнів плазми, у тому числі V (акцелерин) та VII (конвертин) факторів згортання крові. Розчиняє тромби, діючи як на їх поверхні, так і з середини [3].

Стрептокіназа використовується при гострому інфаркті міокарді із зубцем Q - не пізніше ніж через 12 годин від початку захворювання, масивних тромбозах глибоких вен, тромбоемболії легеневої артерії, гострих, підгострих та хронічних тромбозах. Стрептокіназа найбільш ефективна при свіжих згустках фібрину (до ретракції); відновлює прохідність тромбованих кровоносних судин. Після закінчення інфузії фібринолітичний ефект стрептокінази досягає максимуму через 45 хв і спостерігається протягом декількох годин [4].

Проте проблемами використання стрептокінази одержаної з штаму *Streptococcus pyogenes* є висока вартість, примхливість вирощування продуцента

та низький вихід продукту (600мг білку з 1 л бульона). Єдиним варіантом рішення цих проблем є біотехнологічне виробництво рекомбінантної стрептокінази за допомогою штама *Escherichia coli*. Ця технологія включає:

1. Отримання фрагмента ДНК, що несе генетичну інформацію для продукування стрептокінази, методами рекомбінантних ДНК або синтезу відомими методами. Вбудовування фрагмента ДНК з отриманням плазмідного вектора, здатного продукувати стрептокіназу.

2. Введення плазмідної ДНК в відповідну клітку-господаря, таку як *E.coli*.

3. Адаптація клітини-господаря до живильному середовищі певного складу, що складається з основних солей, мікроелементів і джерела вуглецю.

4. Налаштування аерації розчиненням киснем у кількості 0-100%, перемішування зі швидкістю 50-1000 об / хв і підтримання рН в межах 5-8.

5. Додавання антибіотика, такого як канаміцин, ампіцилін і таке інше, в кількості 1-1000 мікрограмів / мілілітр в ферментер.

6. Культивування в ферментере протягом періоду часу від 6 до 24 годин.

7. Та обов'язкове введення додаткових поживних речовин в ферментаційне середу через проміжки часу від 15 до 90 хвилин зі швидкістю від 100 мл / год до 1000 мл / год для збільшення виходу біомаси.

8. Збір культури клітин звичайним центрифугуванням і/або мікрофільтрації.

9. Руйнування клітин *E.coli* за допомогою хімічного лізису, обробки ультразвуком.

10. Виділення та очищення білка стрептокінази від домішок. Розлив та ліофілізація готового препарату [5].

Завдяки вище зазначеним діям була отримана щільна клітинна біомаса, що забезпечує більш високий вихід стрептокінази з клітинного екстракту (750мг білку) та значно зменшує примхливість росту клітин-продуцентів.

Таким чином, технологія продукування стрептокінази з використанням генетично сконструйованого штаму *E.coli*, яка продукує вищевказаний білок всередині клітини є економічно ефективна.

Список літератури:

1. *Perler B.* Современный взгляд на выбор тромболитической терапии / *B. Perler* // Johns Hopkins Hospital. – 2005. – URL: <http://medac.ua/tromboliticheskaya-terapiya.html>.

2. *Панченко Е.П.* Тромболитические препараты в лечении больных острым инфарктом миокарда і / *Е. П. Панченко* // «Атмосфера». – 2001. – С. 135 – 140

3. Фібринолітичні засоби. – URL: https://pidruchniki.com/68310/meditsina/likarski_zasobi_vplivayut_fibrinoliz.

4. *Заика Е.* Возвращение стрептокиназы / *Евгений Заика*. – 2003. – URL: <https://www.apteka.ua/article/14172>.

5. Пат.2127758С1 Российская Федерация, МПК С12 N 9/70 Биотехнологическое получение рекомбинантной стрептокиназы / Хоуйан Сонг; Шангай Медикал Университи, заявл.10.10.1992; опубл. 24.09.1994.